

MARBURG

1965

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg

Direktor: Professor Dr. F. Hartmann

**Untersuchungen über den Austritt
von Zell-Enzymen unter der Einwirkung
verschiedener Gifte am Modell
der isolierten perfundierten Rattenleber**

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

in der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg/Lahn

vorgelegt von

Jochen Robert Möhr

aus Shanghai

Marburg 1965

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg

Direktor: Professor Dr. F. Hartmann

**Untersuchungen über den Austritt
von Zell-Enzymen unter der Einwirkung
verschiedener Gifte am Modell
der isolierten perfundierten Rattenleber**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

in der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg/Lahn

vorgelegt von

Jochen Robert Möhr

aus Shanghai

Marburg 1965

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der
Universität Marburg
am 27.7.1965

gedruckt mit der Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. H. Hensel

Referent: Prof. Dr. med. F.W. Schmidt

Correferent: Prof. Dr. med. G.A. Martini

Inhalts-Verzeichnis

	<u>Seite</u>
A. Einleitung	1
B. Abkürzungen	4
C. Material und Methoden	5
1. Perfusion	5
2. Aufbereitung des Untersuchungs-Materials und Enzym-Bestimmungen	6
3. Chromatographische Isozym-Trennung	6
D. Ergebnisse	11
1. Über das Verhalten der Enzyme aus Rattenleber in Albumin-Tyrode-Lösung und bei Zusatz von DCH, DNP, KCN und JAA	11
2. Anstieg der Enzym-Aktivitäten im Perfusions-Medium	22
3. Anstieg der Isozyme von MDH und GOT im Perfusions-Medium	25
a. Einfluß der Dialyse auf die Enzym-Aktivitäten	25
b. Isozym-Aktivitäten im Perfusions-Medium	26
4. Veränderungen des Enzym- und Isozym-Musters in der Leber	30
E. Diskussion	35
F. Zusammenfassung	45



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Seit den Untersuchungen Warburgs (1) ist bekannt, daß bei Zellschädigungen Enzyme des intermediären Stoffwechsels aus dem geschädigten Organ in den Extracellular-Raum und damit in das Plasma übertreten. Seit etwa 10 Jahren wird aus dieser Tatsache in der praktischen Medizin Nutzen gezogen. Zahlreiche klinische und experimentelle Untersuchungen haben den Wert von Enzym-Aktivitäts-Bestimmungen für die Diagnostik von Leber-, Herz-, Muskel- und Bluterkrankungen gezeigt und sie zu Routine-Methoden werden lassen.

Damit ist eine erhebliche Diskrepanz zwischen der empirisch ausgebauten klinischen Enzymologie und den Kenntnissen über die Pathophysiologie dieses Gebietes entstanden. Bei den Versuchen, dem Phänomen des Enzym-Austritts näherzukommen, fand sich eine gewisse Korrelation zwischen der Höhe des Enzym-Anstiegs im Plasma und den morphologischen und funktionellen Veränderungen im geschädigten Organ, z. B. der Nekrose-Rate oder Schädigungen der Mitochondrien (2, 3). Ebenso zeigte sich eine Abhängigkeit der Enzym Spiegel im Plasma von der Dosierung der schädigenden Agentien und der Dauer der Schädigung (4 - 7). Schließlich wurde der Nachweis erbracht, daß nicht nur irreversible Zellschäden, Nekrosen, zum Enzym-Austritt führen, sondern auch leichtere, vorübergehende Beeinträchtigungen der Zell-Funktion, ja, sogar stärkere, aber noch im physiologischen Rahmen liegende Belastungen (8 - 15).

Eine weitere Aufklärung der Voraussetzungen und Mechanismen des Austritts von Zell-Enzymen erscheint in vielerlei Hinsicht wünschenswert: die diagnostische Sicherheit würde sich damit erhöhen, die differentialdiagnostische Trennschärfe verbessern, Einheit oder Uneinheitlichkeit bestimmter Erkrankungsformen wären möglicherweise zu erkennen, und eventuell könnte man auch prognostische Schlüsse und eine bessere Beurteilung von Therapie-Erfolgen erwarten.

Für derartige Untersuchungen sind wesentliche Voraussetzungen bereits vorhanden:

1. Kenntnisse von Enzym-Mustern der Organe (14 - 16)
2. Kenntnisse über gewebs-typische Enzym-Eigenschaften und Isozym-Muster (17, 18)

3. Kenntnisse der subcellulären Strukturen und der cellulären Enzym- und Isozym-Verteilungs-Muster in ihnen (18 - 23)
4. Kenntnisse über die Verweildauer von Enzym-Aktivitäten im Plasma (4, 24, 25)
5. Die Erfahrung, daß bei Schädigung verschiedener Organe auch im Plasma unterschiedliche Enzym-Muster auftreten, und daß somit aus den Relationen der Enzyme im Plasma zueinander auf ihre Organ- Abstammung geschlossen werden kann (26, 27).
6. Die Erfahrung, daß bei unterschiedlichen Schädigungen eines bestimmten Organs verschiedene Enzym-Muster im Plasma auftreten, daß also dort weder ein Abbild des Herkunfts-Organ-Musters en miniature, noch ein negatives Bild der pathologischen Veränderungen der Enzym-Aktivitäten im Organ erscheint (27).
7. Die Erfahrung, daß bei Berücksichtigung des unter Punkt 1 - 4 Angeführten aus dieser Verzerrung des Enzym-Musters im Plasma Schlüsse auf die Schwere und Ablaufgeschwindigkeit einer Organzellschädigung gezogen werden können (27 - 29).

Dennoch bleiben in praxi genügend Fälle, in denen selbst bei sorgfältiger Beachtung aller bekannten Einzeltatsachen über Organ-Gehalte, Isozym- und Struktur-Muster, Alterungs-Geschwindigkeiten, etc. der im Plasma gemessenen Enzyme die Analyse und Interpretation der Befunde Schwierigkeiten bereitet. Der Wert der so gewonnenen zu unbestimmten Aussagen, z. B. die alleinige Feststellung des Herkunfts-Organs oder einer mäßigen, nicht lokalisierbaren Zell-Schädigung, bleibt hinter der hohen Spezirität der verwandten Methoden und der Sensibilität und Trägheitsarmut des zu Grunde liegenden Phänomens weit zurück.

Im Folgenden werden Versuche dargestellt, die dazu beitragen sollen, den Mechanismus des Enzym-Austritts aus den Zellen näher zu definieren.

Als Versuchsobjekt wurde die Leber gewählt, der ja auch in der angewandten Enzymologie die größte Bedeutung zukommt. Wegen der Komplexität des Phänomens Enzym-Austritt war eine Begrenzung des Untersuchungszieles notwendig: Die Unberechenbarkeit der

spontanen Krankheitsverläufe erzwang das Tierexperiment, zur Ausschaltung übergeordneter Regulationen und zur Vermeidung einer Überlagerung der untersuchten Enzym-Relationen durch gleichzeitigen Enzym-Austritt aus anderen Organen wurde die Leber isoliert.

In der isolierten perfundierten Überlebenden Rattenleber bietet sich eine Einheit, bei der einerseits noch die anatomischen und auch ein Großteil der physiologischen Verhältnisse des Organs gewahrt bleiben, die aber andererseits gezielten, reproduzierbaren Versuchsanordnungen unterworfen werden kann, und von der außerdem durch zahlreiche Untersuchungen vielerlei Bezugs-Daten bekannt sind.

An diesem Modell wurde unter hypoxischen Bedingungen der Austritt von 17 Hauptknoten-Enzymen im Verlauf 4-stündiger Perfusion unter der Einwirkung verschiedener Gifte, deren Angriffspunkte in etwa bekannt sind, untersucht. Um den zeitlichen Ablauf der strukturellen Zellschaden näher zu erfassen, wurde nach Entwicklung einer brauchbaren Methode auch das Verhalten der Isozyme der GOT und MDH untersucht, deren intracelluläre Verteilung in der Ratten- (und Menschen-) Leber bekannt ist.

Abkürzungen

ADH	= Alkohol-Dehydrogenase
ALD	= Fruktose - 1,6, -Diphosphat-Aldolase
ENO	= Enolase
GAPDH	= Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GDH	= α -Glycerophosphat-Dehydrogenase
GLDH	= Glutamat-Dehydrogenase
GOT	= Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	= Glutamat-Pyruvat-Transaminase
ICDH	= Isocitrat-Dehydrogenase
LDH	= Lactat-Dehydrogenase
MDH	= Malat-Dehydrogenase
PFA	= Fruktose-1-Phosphat-Aldolase
PGDH	= 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
PGK	= Phosphoglycerat-Kinase
PK	= Pyruvat-Kinase
SDH	= Sorbit-Dehydrogenase
ZF	= Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Zwischenferment)

C-Raum = cytoplasmatischer Raum

M-Raum = mitochondrialer Raum

AT = 2,5 % Serum-Albumin vom Rind in Tyrode-Lösung mit 1,3 mMol
Lactat und 0,09 mMol Pyruvat / Liter, pH 7,3

DCH = AT + 1 mMol Na-Desoxycholat/Liter, pH 7,3

DNP = AT + 1 mMol 2,4-Dinitrophenol/Liter, pH 7,3

JAA = AT + 1 mMol Monojodacetat/Liter, pH 7,3

KCN = AT + 1 mMol Kaliumcyanid/Liter, pH 7,3

Material und Methode

Es wurden die Lebern von weiblichen Ratten (230 - 280 g) eines Wistar-Stammes verwandt. Die Tiere erhielten Latz-Standard-Kost bis 12 Stunden vor der Entnahme der Leber, Wasser ad. lib. bis zum Versuchs-Beginn.

Die Hepatektomie erfolgte in üblicher Weise: Äthernarkose; nach Injektion von 0,4 ml Liquemin in die Vena femoralis wurden die Vena portae und die Vena cava caudalis oberhalb der Einmündung der Venae hepaticae canuliert und die Vena cava caudalis unterhalb der Einmündung der Lebervenen unterbunden, darauf die Arteria hepatica. Anschließend erfolgte die Hepatektomie. Zeitdauer der Isolierung $3\frac{1}{2}$ - 5 Minuten bis zum Anschluß an die Perfusion.⁺

Die Perfusion erfolgte nach der Methode von L. L. Miller (30) in der Modifikation von Schimmassek (31 - 34)⁺⁺ im geschlossenen System.

Volumen des Perfusions-Mediums: 175 ml (im Beginn) - 125 ml (am Ende der Perfusion). Dauer: 4 Stunden. Durchfluß-Geschwindigkeit: 6 - 7 ml/min/g. Hydrostatischer Druck 160 mm H₂O.

Perfusions-Medien:

1. AT = 2,5% Serum-Albumin (Rind reinst (Behring-Werke))
1,33 mM Na-Lactat, 0,09 mM Na-Pyruvat in Tyrode-Lösung pH 7,3
2. KCN = AT mit Zusatz von 1 mM Kaliumcyanid
3. DCH = AT mit Zusatz von 1 mM Na-Desoxycholat
4. DNP = AT mit Zusatz von 1 mM 2,4-Dinitrophenol
5. JAA = AT mit Zusatz von 1 mM Monojodacetat.

Die Entnahme der Untersuchungsproben (je 10 ml) erfolgte aus dem ständig gerührten Vorrats-Gefäß 3 - 5 Minuten, 1 Stunde, 2, 3 und 4 Stunden nach Perfusions-Beginn. Die Entnahmen wurden nicht kompensiert.

⁺ Herrn Dr. Ch. Herfarth (Chirurg. Univ.-Klinik, Marburg), der die Hepatektomien durchführte, sei an dieser Stelle nochmals herzlichst gedankt.

⁺⁺ Herrn Priv. Doz. Dr. H. Schimmassek (Physiol.chem. Institut d. Univ. Marburg) verdanken wir wertvolle Ratschläge und die Einführung in die Methodik der Perfusion.

Noch in situ erfolgte sofort nach der Laparotomie die Resektion des Lobus caudatus zur Bestimmung des Enzym-Musters der Leber. Nach Beendigung der Perfusion wurde eine Probe aus der Mitte des Lobus sinister zu gleichen Zwecken entnommen.

Aufbereitung des Untersuchungs-Materials:

1. Leber:

Ultra-Turrax Homogenisation 2 Minuten in 0,04 ml 0,15 M NaCl/mg Feuchtgewicht unter Eis/Salz-Kühlung. 30-minütige Zentrifugation bei 20.000 g und + 4°C. Verwendung des Überstandes.

2. Perfusions-Medium:

10-minütige Zentrifugation bei 5000 g bei + 4°C (Abtrennung eventueller korpuskulärer Verunreinigungen).

Aufbewahrung des Untersuchungs-Materials im Eisbad.

Bestimmung der Aktivitäten der Enzyme ADH, ALD, EFO, GAPDH, GDH, GLDH, GOT, GPT, ICDH, LDH, LLDH, PFA, PGDH, PCK, PK, SDH und ZF innerhalb von 6 Stunden nach (35).

Protein-Bestimmung nach Weichselbaum (36).

Angabe der Enzym-Aktivitäten in mU/ml, bzw. U/g oder mU/mg Protein.

Isozym-Bestimmungen

Die Notwendigkeit, teilweise nur sehr geringe Enzym-Aktivitäten in proteinreichen Lösungen in ihre Isozyme zu trennen und gleichzeitig nebeneinander mehrere Medien zu untersuchen, zwang zur Entwicklung einer einfachen, aber genauen chromatographischen Trenn-Methode. Mit DEAE-Sephadex stand ein Adsorptionsmittel von hoher Kapazität zur Verfügung, die Vereinfachung der Trennung gegenüber den gebräuchlichen kontinuierlichen und diskontinuierlichen Elutions-Verfahren gelang dadurch, daß sich eine einwandfreie Trennung auch bei Verwendung von nur 2 Elutions-Mitteln als möglich erwies.

Folgende Anordnung erwies sich als besonders günstig:

Säulenlänge 8 cm, Säulendurchmesser 0,8 cm. Abschluß der Säule: Filter aus Kunststoff-Papier (Ederol R 1), 12-er V₂A-Kanülen als Auslauf durch Abschluß-Stopfen. Säulen und Sammelröhrchen durch Eiswasser-durchströmten Mantel gekühlt. Einheiten aus

Säule und aufgesetztem Vorratsgefäß 23 cm hoch. Füllung: 280 mg DEAE-Sephedex A 50 medium.

Elutions-Lösungen: 1) 0,008 M Phosphat-Puffer, pH 7,0

2) 0,2 M Phosphat-Puffer, 0,2M an NaCl pH 7,0.

Elutionsvolumina: 4 Fraktionen à 3 ml = 12 ml Lösung 1

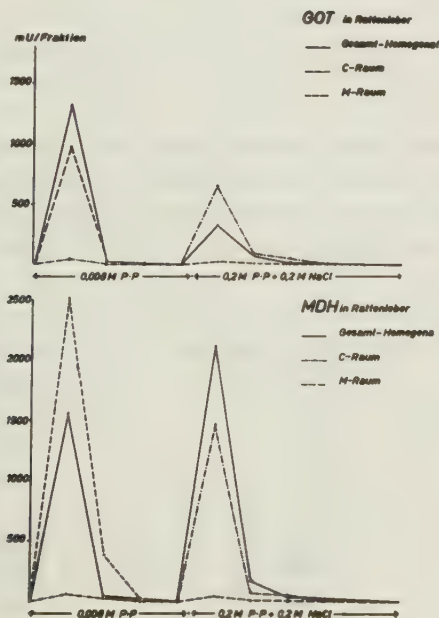
6 Fraktionen à 5 ml = 30 ml Lösung 2

Elutions-Dauer ca. 4 Stunden.

Die beschriebene Chromatographie-Anordnung erlaubt eine einwandfreie Trennung der Isozyme von GOT und MDH, da beide nur zwei sicher definierte Isozyme besitzen, von denen jeweils eines dem cytoplasmatischen, eines dem mitochondrialen Raum der Leber entstammt. Das M-Isozym der ICDH erwies sich bei den auftretenden Verdünnungen als zu instabil. (Auch ist die Verteilung der ICDH in der Ratten-Leber sehr einseitig zu Gunsten des C-Isozyms: 7 % : 93 %).

Es ist bekannt, daß die cytoplasmatischen Isozyme von GOT und MDH an DEAE-Cellulose adsorbierbar sind, die mitochondrialen jedoch nicht (18, 23).

Abb. 1



Wie Abb. 1 zeigt, verhalten sie sich an DEAE-Sephadex ebenso: Bei der Chromatographie des Gesamt-Homogenates erhält man von MDH wie von GOT 2 steile scharf abgesetzte Gipfel. Wird die Leber vorher nach Bücher (16) fraktioniert extrahiert und die so gewonnenen Extrakte der beiden großen Zell-Räume getrennt chromatographiert, so findet sich jeweils nur 1 Aktivitäts-Gipfel: die Isozyme des cytoplasmatischen Raumes werden adsorbiert, diejenigen des mitochondrialen Raumes nicht. Die sehr geringen (unter 5 % liegenden) Anteile der C-Isozyme im M-Raum-Extrakt und der M-Isozyme im C-Raum-Extrakt entsprechen der stets gegebenen und mittels Parallel-Messung von LDH und GLDH bestimmbaren Verunreinigung der Extrakte durch Elemente des nicht gewünschten Zell-Raumes (18).

Die mit dieser "Kurzsäule" ermittelte durchschnittliche Verteilung von MDH- und GOT-Aktivität in der Rattenleber auf ihre Isozyme, die zugehörige Streuung sowie die mittlere Ausbeute mit zugehöriger Streuung zeigt Tab. I.

Tab. I

Enzym	n	C-Isozym Mittelwert	M-Isozym Mittelwert	Streuung s	Ausbeute u. deren Streuung
MDH	24	62%	38%	$\pm 9,6\%$	95% $\pm 16\%$
GOT	24	21%	79%	$\pm 5,6\%$	100% $\pm 30\%$

Diese Verteilung wird weder durch das Eintragen sehr geringer oder sehr hoher Enzym-Aktivitäten (Tab. II) noch durch das Vorhandensein größerer Mengen von Albumin im Chromatographiegut (Tab. III) wesentlich beeinflusst.

Tab. II

Eingesetzte Enzym-Aktivität	nicht adsorbiert = M-Isozym	adsorbiert = C-Isozym
12 mU GOT	77%	23%
90 mU GOT	83%	17%
220 mU GOT	74%	26%
450 mU MDH	38%	62%
3090 mU MDH	40%	60%
9300 mU MDH	36%	64%

Tab. III

Eingesetzte Enzym-Aktivität und Protein-Menge	MDH-Aktivität nicht adsorbiert	MDH-Aktivität adsorbiert
6490 mU C-MDH ohne Albumin	1,8%	98,2%
6490 mU C-MDH + 75 mg Alb.	1,8%	98,2%
6490 mU C-MDH + 150 mg Alb.	1,7%	98,3%
6490 mU C-MDH + 225 mg Alb.	1,6%	98,4%

Die hohe Kapazität der verwandten Säule, die bereits aus Tab. III hervorgeht, wird gleichfalls durch die Tab. IV an einem typischen Beispiel demonstriert.

Tab. IV

Eingesetzte Menge Serum-Albumin v. Rind, reinst	Ausbeute mg	%	nicht adsorbiert mg	%
25 mg	20	80	0	0
50 mg	37	75	0,3	0,9
100 mg	63	63	0,1	0,2
200 mg	107	53	1,1	1

200 mg Protein werden von der Säule also noch fest adsorbiert, allein die Ausbeute geht mit steigenden eingesetzten Proteinmengen regelmäßig zurück. Das gesamte aufgetragene Protein wurde - wie auch von längeren DEAE-Cellulose-Säulen und auch bei wesentlich ausgiebigerer Elution - nur sehr selten quantitativ zurückgewonnen. In dem bei den folgenden Versuchen meist vorliegenden Bereich von 1 - 100 mg Protein lag die Ausbeute in der Regel zwischen 70 und 80 %.

Die Vergleichbarkeit des Isozym Musters von MDH und GOT in der Rattenleber bei Anwendung verschiedener Trennmethode ist in der Tab. V gezeigt.

Tab. V

Verfahren	C-LDH	M-MDH	C-GOT	M-GOT
8-cm-Kurzsäule, DEAE-Sephadex	62%	38%	21%	79%
12-cm Säule- 4 Elutions-Mittel, DEAE-Sephadex	65%	35%	25%	75%
12-cm-Säule- 4 Elutions-Mittel, DEAE-Cellulose	62%	38%	15%	85%
45-cm-Säule, kontinuierliche Elution	67%	33%	23%	77%
Fraktionierte Extraktion nach Bücher	63%	37%	24%	76%

Die Unterschiede sind - vielleicht mit Ausnahme der GOT bei der DEAE-Cellulose-Säule mit 4 Elutionsmitteln - zu vernachlässigen.

Ergebnisse

1. über das Verhalten der Enzyme aus Rattenleber in Albumin-Tyrode-Lösung (AT) und bei Zusatz von DCH, DNP, KCN und JAA.

Zweck der in diesem Kapitel beschriebenen Versuche war es, annähernd Art und Ausmaß der Veränderungen der Enzym-Aktivitäten zu bestimmen, denen sie in der Zeit ihres Verweilens im Kreislauf während der Perfusion unterliegen, um sie soweit als möglich bei der Berechnung der Ergebnisse berücksichtigen zu können.

Hierzu wurden konzentrierter Gesamt-Extrakt und Extrakte von C- und M-Raum aus Rattenlebern in 0,15 M NaCl hergestellt und mit AT allein und unter Zusatz von 1 mMol der zur Schädigung bei der Perfusion verwandten Gifte, verdünnt.

Diese Gemische wurden - entsprechend der Perfusions-Temperatur - bei 37°C und zum Studium des Temperatur-Einflusses auch bei 20°C inkubiert.

Im unverdünnten Extrakt wurden unmittelbar vor dem Verdünnen und in den Gemischen 5 Min., 1 h, 2 h und 4 h nach dem Ansetzen die Enzym-Aktivitäten bestimmt.

Die Aktivitäts-Änderungen verliefen meist in zwei deutlich von einander abgesetzten Phasen, einer schnellen, von nun an als "Sofort-Effekt" bezeichnet, und einer langsamen, von nun an als "Alterung" bezeichnet.

1. Phase: "Sofort-Effekt":

Anmerkung: Nachdem festgestellt wurde, daß von der kürzest-möglichen Zeit nach dem Ansetzen der Verdünnung bis zu einer Zeitspanne von 5 Min. keine verwertbaren Unterschiede im Verhalten der Enzyme zu finden waren, wurde der Zeitraum, nach dem der Sofort-Effekt geprüft wurde, einheitlich auf 5 Min. nach dem Vermischen festgesetzt.

Augenscheinlich treffen beim Sofort-Effekt mehrere Faktoren zusammen, die zur Änderung der Enzym-Aktivitäten führen können:

- a. die Verdünnung,
- b. das andere Milieu (bezüglich nieder- wie auch hochmolekularer Substanzen und eventueller direkter toxischer Wirkungen)
- c. die veränderte Temperatur (Ausgangstemperatur des Homogenates: +2 - +4°C).

a. Die Verdünnung

Den Einfluß des Verdünnungs-Grades demonstriert Tab. VI am Verhalten der Enzym-Aktivitäten in AT.

Tab. VI

Verhalten der Enzym-Aktivitäten in A.T. bei steigender Verdünnung bei 37°C in % des theoretischen Erwartungswertes. (Ausgangsmomente: 12 - 15 mg Extrakt-Protein / ml)

Enzym	Verdünnung				
	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80
ADH	90	87	80	76	-
ALD	113	125	130	-	-
ENO	-	174	205	218	-
CAPDH	75	67	55	45	-
GDH	83	76	69	-	-
GLDH	167	195	225	-	-
GOT	-	102	105	107	109
GPT	-	135	139	160	-
ICDH	-	111	115	121	-
LDH	-	111	120	135	157
LIDH	-	117	125	150	174
PFA	128	148	158	-	-
PGDH	119	122	139	-	-
PGK	-	106	109	120	-
PK	-	108	111	116	-
SDH	131	138	158	-	-
ZF	75	60	54	-	-

Die Aktivitäts-Änderungen bei zunehmender Verdünnung in AT bestanden überwiegend in Aktivitäts-Zunahmen: nur ADH, CAPDH, GDH und ZF verloren sofort Aktivität. Dabei erwiesen sich sowohl Zu- wie auch Abnahmen dem Logarithmus der Verdünnung proportional mit Ausnahme von LDH, LIDH und PGK, deren Aktivitäts-Steigerungen dem Verdünnungsgrad direkt parallel liefen.

b. Das andere Milieu

Bei gleichem Verdünnungsgrad (auf ca. 1,2 - 1,5 mg Extrakt-Protein/ml) fanden sich, wie die Tab. VII zeigt, deutliche Unterschiede, je nachdem, in welchem Medium, bzw. mit welchem Zusatz zu AT, die Enzyme verdünnt wurden.

Tab. VII

"Sofort-Effekt" auf die Enzym-Aktivitäten bei Verdünnung in AT und unter Zusatz von DCH, DNP, KCN und JAA.

(Aktivitäten in % des theoretischen Erwartungswertes.
Extrakt-Protein: 1,2 - 1,5 mg/ml. Temperatur: 37°C)

Enzym	AT	DCH	DNP	KCN	JAA
ADH	84	175	145	169	149
ALD	108	108	54	121	111
ENO	105	99	104	102	99
GAPDH	33	52	41	18	10
GDH	140	136	46	142	147
GLDH	111	37	30	37	32
GOT	72	77	84	25	78
GPT	141	123	91	10	114
ICDH	113	128	99	31	116
LDH	118	99	115	103	89
MDH	129	126	129	129	131
PFA	142	136	57	121	133
PGDH	132	131	65	104	156
PGK	96	34	32	37	32
PK	76	34	102	34	70
SDH	106	107	95	92	109
ZF	33	70	13	63	31

Auch bei den toxischen Medien überwiegen als Sofort-Wirkung (mit Ausnahme von DNP) die Aktivitäts-Steigerungen, die wohl - wie bei AT allein - verdünnungsbedingt sind.

Nur wenige Enzyme verhielten sich in allen Medien sehr ähnlich:

ADH, die eine deutliche Zunahme, ENO, die kaum eine Änderung und GLH, die eine geringe Aktivitäts-Minderung erfuhr. Am häufigsten wichen die Enzym-Aktivitäten in DNP von ihrem Verhalten in den übrigen Medien ab. In KCl fällt die starke Hemmung beider Transaminasen aus den Rahmen. Die GAPDH erleidet als einziges Enzym in allen Medien eine sehr starke Aktivitäts-Einbuße.

c. Die höhere Temperatur

Der Effekt der gegenüber dem unverdünnten Homogenat ($+2^{\circ}$ - $+4^{\circ}\text{C}$) höheren Temperatur nach dem Mischen ist nur schwer abzuschätzen, da er sich mit den beiden schon genannten Faktoren steigend oder nivellierend überlagert und nach 5 Minuten möglicherweise seine volle Wirkung noch nicht entfaltet hat.

Bei Versuchen mit Verdünnungen bei 20°C und 37°C zeigten die einzelnen Enzyme ein so unterschiedliches Verhalten, daß darin keine generelle Gesetzmäßigkeit - etwa im Sinne der KGT-Regel - zu erblicken war (Tab. VIII).

Tab. VIII

Der Einfluß der Mischungs-Temperatur auf die Enzym-Aktivitäten in den verschiedenen Medien. (Angaben in % des theoretischen Erwartungswertes. Extrakt-Protein: 1,2 - 1,5 mg/ml).

Enzym	20°AT		20°DCH		20°DNP		20°KCl		20°JAA	
	20°	37°	20°	37°	20°	37°	20°	37°	20°	37°
ADH	103	84	102	175	21	145	143	169	81	149
ALD	106	108	108	108	81	54	87	121	111	120
ENO	88	105	94	99	85	104	91	102	95	99
GAPDH	83	33	78	52	77	41	65	18	42	10
GDH	131	140	128	136	113	46	112	142	125	147
GLDH	93	111	109	87	110	80	106	87	114	82
GOT	93	72	100	77	88	84	34	25	101	78
GPT	109	141	101	123	85	91	27	10	110	114
ICDH	113	113	106	128	105	99	109	81	112	116
LDH	109	118	87	99	102	115	97	103	121	89
MDH	104	129	110	126	103	129	94	129	117	131
MTA	120	142	118	138	96	57	101	121	133	135
PGDH	123	132	106	131	83	65	98	164	91	156
PKK	118	96	118	84	112	82	93	87	83	82
PK	120	76	122	84	98	102	95	84	102	70
SDH	106	106	105	107	96	93	106	99	104	109
ST	95	88	107	70	74	13	90	68	102	81

Am weniger als einem Drittel beträgt die Aktivitäts-Änderung bei 37°C etwa das Doppelte von der bei 20°C, wie es der Relation beider Temperaturen zur Ausgangs-Temperatur des Homogenates entsprechen würde. Allerdings ist das Ausmaß der Änderungen bei 37°C oft größer als bei 20°C und zwar sowohl in Fällen von Aktivierung wie auch Hemmung der Enzym-Aktivitäten. Eine bei 37°C nicht mehr nachweisbare Aktivierung bei 20°C, wie sie bei manchen Enzymen in einigen Fällen vorkommt, ließe sich auf die beginnende thermische Inaktivierung zurückführen, die den Einfluß von Verdünnung und Albumin-Zusatz gegensinnig überlagert.

Das Verhalten der cytoplasmatischen und mitochondrialen Isozyme von GOT, ICDH und LDH wurde ebenfalls wie das ihrer Gemische untersucht, da größere Unterschiede in ihrem Verhalten die Auswertung ihrer chromatographisch bestimmten Relationen im Perfusionsmedium stark verzerren können.

Die Veranreinigung der zu diesen Versuchen durch fraktionierte Extraktion nach Bücher getrennten Säure wurde chromatographisch bestimmt. Durchschnittlich betrug sie für die cytoplasmatische Fraktion 7,9% L-Isozyme, für die mitochondriale Fraktion ca. 10% C-Isozyme.

Überraschenderweise fand sich bei der Inkubation mit den 5 verschiedenen Medien (bei 37°C) meist keine sehr erheblichen Unterschiede zwischen C-Isozym und L-Isozym (Tab. IX).

Tab. IX

"Sofort-Effekt" auf die Isozym-Aktivitäten von GOT, ICDH und LDH bei Verdünnung in AT und unter Zusatz von DCH, DNP, KCH und JAA bei 37°C.

(Angaben in % des theoretischen Erwartungswertes. Extrakt-Protein: 1,2 - 1,5 mg/ml).

Medium	C-GOT	L-GOT	C-ICDH	L-ICDH	C-LDH	L-LDH
AT	104	98	99	98	118	128
DCH	104	104	98	103	118	130
DNP	92	101	92	40	112	128
KCH	60	21	78	75	120	132
JAA	94	110	96	84	127	132

Beide Isozyme der MDH weisen in allen Medien Aktivitäts-Steigerungen etwa gleichen Ausmaßes (zwischen 12 und 32%, im Mittel 24%) auf.

Die GOT-Isozyme unterscheiden sich bei nur kleinen Änderungen der Aktivität ebenfalls nur unwesentlich voneinander mit einer Ausnahme: die auch im Gemisch nachweisbare deutliche Hemmung beim Verdünnen in KCN ist ganz überwiegend auf die fast 4 mal so große Aktivitäts-Abnahme des mitochondrialen Isozyms zurückzuführen, das ca. 75% des Gemisches im Rattenleber-Homogenat bildet.

Die Isozyme der IDH verhalten sich in allen Medien außer in DNP ähnlich. In DNP allerdings ist die Aktivität des C-Isozyms praktisch erhalten, während die des M-Isozyms auf weniger als die Hälfte absinkt.

2. Phase: Alterung.

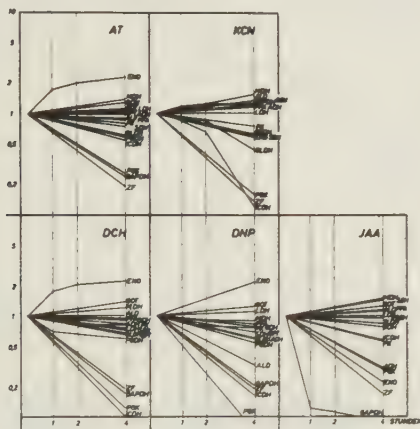
Für die nach dem Sofort-Effekt in Abhängigkeit von der Zeit eintretende Aktivitäts-Änderung der Enzyme in den verschiedenen Medien ist es in vielen Fällen begründet, anzunehmen, daß der Beziehung Aktivität - Zeit ein exponentielles Gesetz zugrunde liegt. Stellt man nämlich die Aktivität in logarithmischem Maßstab über der Zeit aufgetragen dar, so ergibt sich meist wie Abb. 2 zeigt, ein linearer Verlauf.+

+ Für die Einführung und die Hilfe bei der Berechnung danke ich Herrn Dr. H.-K. Dettmar (Farbenfabriken Bayer, Leverkusen) auf das herzlichste.

Abb. 2

Aktivitäts-Änderungen der Enzyme in den verschiedenen Perfusionsmedien innerhalb von 4 Stunden bei 37°C.

(Ausgangs-Aktivität = 1; Ordinate (Aktivität) logarithmisch, Abszisse (Zeit) linear; Mittelwerte aus 4 - 8 Ansätzen).



Der Verlauf der Alterung ist durch die Steigung B der Ausgleichsgeraden für die Meßwerte charakterisiert. Bezeichnen wir die im verdünnten Homogenat gemessene Aktivität als E_A^* , so ergibt sich bei Darstellung im dekadischen Logarithmus

$$(1) \quad \log E_A^* = Bt \quad \text{oder} \quad E_A^* = 10^{Bt}$$

oder im natürlichen Logarithmus

$$(2) \quad \ln E_A^* = \alpha t \quad \text{oder} \quad E_A^* = e^{\alpha t}$$

wobei $B = 2,3\alpha$ ist.

($\alpha, B > 0$ bei Abnahme, $\alpha, B < 0$ bei Zunahme der Akt. infolge der Alterung.)

Für die Alterung je Enzym und Verdünnungsmedium charakteristische Exponent α (Tab. X) läßt sich auf die angedeutete Weise graphisch angenähert bestimmen. Da es aber manchmal wegen

der Streuung der Beobachtungswerte schwierig ist, eine Ausgleichsgerade zu zeichnen (Beobachtungswerte = Mittelwerte aus jeweils 4 - 8 Messungen) ist die rechnerische Ermittlung von α genauer.

Nach DETLEFSEN bietet sich hier die Methode der kleinsten Fehlerquadrate an:

$$(3) \quad \sum_{i=1}^n (\text{Fehler})_i^2 = \sum_{i=1}^n (\log f_i + B t_i)^2 = \text{Minimum}$$

$$(4) \quad B = - \frac{\sum_{i=1}^n t_i \times \log f_i}{\sum_{i=1}^n t_i^2}$$

$$\alpha = 2,3 B$$

Tab. X

Alterungs-konstante α der Enzym-Aktivität bei 37°C in AT und bei Zusatz von DCH, DNP, KCN und JAA

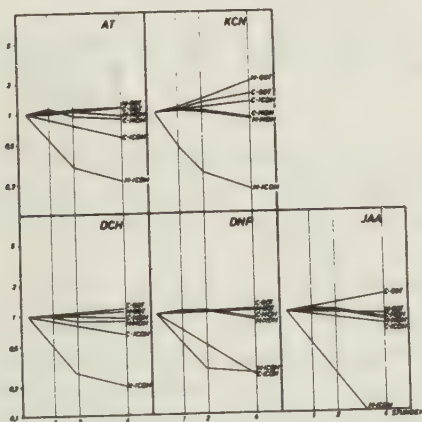
	AT	DCH	DNP	KCN	JAA
LDH	-0,0171	0,0685	-0,0251	-0,0098	-0,0224
MDH	-0,0862	-0,0455	-	-0,0908	-0,1281
GLDH	0,1119	0,1200	0,1272	-	0,0492
SODH	0,0648	0,0805	0,0993	0,1244	0,4684
ADH	0,0317	0,0543	0,1309	-0,0620	0,3014
JGDH	0,1497	0,5625	0,4140	-	0,1276
ZF	0,4014	0,4426	0,4610	0,5042	0,3922
PGDH	0,1250	-	0,1344	-	0,0131
PFA	0,0373	0,0248	0,0519	-0,0503	0,0280
ALD	-	0,0102	0,2780	-0,0711	-0,0290
GDH	-0,0743	-	0,0449	-	0,0603
PK	0,0446	0,0537	-	0,0664	0,1395
ENO	-	-	-0,2042	0,1189	0,3788
GOT	-0,0266	-0,0632	-0,0508	-	-0,0630
GPT	-0,0198	0,1209	0,1286	0,2344	-0,0247
GAPDH	0,4027	0,5094	0,4371	-	-
PGK	0,3265	0,5477	0,6588	0,3938	0,2906

keine Angabe = nicht-exponentieller Verlauf der Alterung

Für die Isozyme von MDH, GOT und ICDH wurden unterschiedliche Alterungs-Konstanten α gefunden, die sich, wie die Sofort-Effekte, bei MDH und GOT nur wenig voneinander unterschieden. Die mitochondriale ICDH allerdings altert außerordentlich rasch.

Abb. 3

Aktivitäts-Änderungen der Isozyme von MDH, GOT und ICDH in den verschiedenen Perfusions-Medien innerhalb von 4 Stunden bei 37°C. (Ausgangs-Aktivität = 1; Ordinate (Aktivität) logarithmisch, Abszisse (Zeit) linear; Mittelwerte aus 3 - 6 Ansätzen).



Auffällig ist, daß hier in weniger als der Hälfte der Fälle ein exponentieller Alterungs-Verlauf vorlag. (Tab. XI)

Tab. XI

Alterungs-Konstante α der Isozym-Aktivitäten von MDH, GOT und ICDH in AT und bei Zusatz von DCH, DNP, KCN und JAA.

	AT	DCH	DNP	KCN	JAA
M-MDH	-	-	-	-	-
C-MDH	-	-	-	-	-
M-GOT	-	-0,0271	-	-0,6100	0,0257
C-GOT	-	-0,0391	-0,0225	-0,3410	-0,0950
M-ICDH	-	-	-	-	0,7484
C-ICDH	0,1152	0,0966	0,3583	-0,0692	0,0633

keine Angabe = nicht-exponentieller Verlauf der Alterung.

Prüfgröße F

Bei der Bestimmung von α ist vorausgesetzt, daß die Alterung einem exponentiellen Gesetz folgt. Ob diese Annahme für die gegebenen Beobachtungswerte zutrifft, läßt sich nach DETLEAR statistisch mit Hilfe der Prüfgröße F berechnen.

$$(5) \quad F = \frac{\sum_{i=1}^n y_i^2}{s_{(y-Y)}^2} \quad \begin{array}{l} n = \text{Anzahl der Beobach-} \\ \text{tungswerte; der Wert } f_0 = 1 \\ \text{zählt nicht mit.} \end{array}$$

$$(6) \quad \text{wo } s_{(y-Y)}^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (y_i - Y_1)^2 = \text{Streuung der Approximations- fehler}$$

bedeuten.

In unserem Falle ergibt sich bei Zugrundelegen einer Wahrscheinlichkeit von 95% für F ein Wert von $< 18,5$, wenn die Voraussetzung eines exponentiellen Alterungsgesetzes nicht gegeben ist.

Die Kenntnis der "Bofort-Effekt-Faktoren" (Tab. VII und Tab. IX) und der "Alterungs-Konstanten α " (Tab. X und Tab. XI) für die einzelnen Enzyme und die verschiedenen Medien ermöglicht es, die im Verlauf der Perfusionen im Kreislauf gemessenen Enzym-Aktivitäten bezüglich ihrer extra-cellulären Veränderungen einer Korrektur zu unterziehen.

Bezeichnen wir als

$E(t)$ die Aktivität, die im Perfusionskreislauf zur Zeit t meßbar wäre, wenn sie keiner Veränderung durch Alterung unterliegen würde; und als

$E_A(t)$ die tatsächlich im Kreislauf zur Zeit t gemessene Aktivität, so gilt als Beziehung

$$(7) \quad E_A(t) = f(T) E(0) + \int_0^T f(T-t) \frac{dE(t)}{dt} \times dt$$

oder

$$(8) \quad E(T) = E_A(T) + \int_0^T E_A(t) \times dt$$

Als Meßwerte bekannt sind:

$$E_A(0), E_A(T_1), E_A(T_2), \dots$$

Gesucht werden:

$$E(T_1), E(T_2), \dots$$

Es sei

$$(9) \quad F_i = \int_{T_{i-1}}^{T_i} E_A(t) dt$$

$$(10) \quad F_i = \int_0^{T_i} E_A(t) dt = \sum_{k=1}^i \Delta F_k$$

gesetzt, dann läßt sich (8) in der Form

$$(11) \quad E(T_i) = E_A(T_i) + \alpha F_i$$

schreiben.

Angenähert gilt dafür

$$(12) \quad \Delta F_i = \int_{T_{i-1}}^{T_i} E_A(t) dt \approx \frac{T_i - T_{i-1}}{2} [E_A(T_i) + E_A(T_{i-1})]$$

Dennach ist:

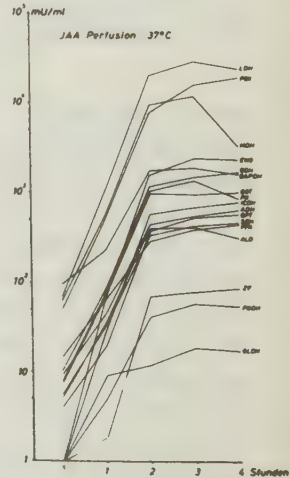
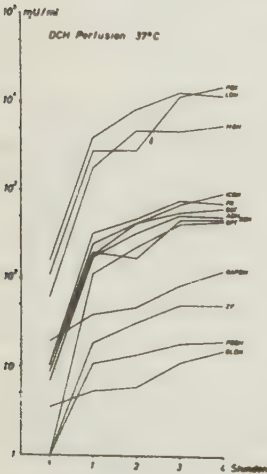
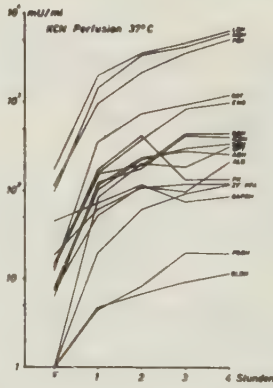
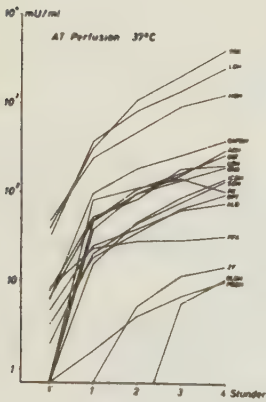
$$(13) \quad E(T_i) = E_A(T_i) + \alpha \sum_{k=1}^i \Delta F_k$$

Die so ermittelten Zahlen für $E(t)$ stellen allerdings immer noch nur Annäherungswerte an die tatsächlich aus der Leber ausgetretenen Enzym-Aktivitäten dar: zwar lassen sich auf die beschriebene Weise die Effekte von Milieu und Temperatur, die während der ganzen Perfusion recht konstant bleiben, weitestgehend auskorrigieren, der, wie oben dargestellt, sehr wirksame Faktor der Verdünnung, der sich in schwer kontrollierbarer Weise fortwährend ändert, wird indessen nur teilweise erfaßt. Auf letzteren und möglicherweise noch weitere, uns noch unbekannte Einflüsse, denen die Enzym-Protein-Moleküle extra-cellulär unterliegen, möchten wir Unregelmäßigkeiten in den korrigierten Anstiegs-Kurven einiger Enzym-Aktivitäten in bestimmten Medien zurückführen.

2. Enzym-Anstieg im Perfusions-Medium.

Abb. 4

Anstieg der Enzym-Aktivitäten im Perfusions-Medium im Verlauf der Perfusion mit AT und unter Zusatz von KCN, DCH, DNP und JAA bei 37°C. (Mittelwerte aus 2 - 6 Verläufen)



Bei den 6 Perfusionen mit AT als Medium stiegen die Enzym-Aktivitäten im Laufe von 4 Stunden im Medium schon beträchtlich an. In der 1. Stunde ist der Anstieg steil und erreicht im Durchschnitt etwa das 8-fache der Ausgangswerte. Bei den meisten Enzymen wird er dann deutlich flacher: in der 2. Stunde wird das im Mittel 17-fache, in der 3. Stunde das 28-fache und am Ende der Perfusion nach 4 Stunden das 46-fache erreicht. Die untersuchten Enzyme bilden nach der Höhe ihres Anstiegs im Medium 3 Gruppen, von denen die obere aus LDH, LDH und PKK, die untere aus den beiden Enzymen des Hexose-Monophosphat-Zyklus, und der mitochondrialen G6PDH besteht; der Rest befindet sich in der Mittelgruppe. Die Aktivitäten in den 3 Gruppen unterscheiden sich jeweils voneinander um etwa eine Größenordnung.

Am Ähnlichsten zu AT allein unter den toxischen Medien verhalten sich die Enzym-Aktivitäten bei Zusatz von KCN (4 Perfusionen). Die Enzym-Anstiegs-Kurven verlaufen allerdings in den ersten beiden Stunden steiler (auf das 12- bzw. 24-fache der Anfangs-Aktivitäten ansteigend), und alle Enzym-Aktivitäten sind bereits nach 1 Stunde im Medium meßbar. Dann flacht sich der Anstieg der Kurven jedoch stärker ab, sodaß am Ende der Perfusion kaum höhere Aktivitäten nachzuweisen sind als in AT. Auffällig ist der hohe Anstieg von GOT und ZF, sowie der wohl nur scheinbare - auf möglicherweise unzureichender Korrektur beruhende - nur geringe Anstieg und spätere Rückgang der GAPDH-Aktivität, wie auch der Abfall der PK-Aktivität in der 3. und 4. Stunde.

Etwa doppelt so hoch steigen die Enzym-Aktivitäten durchschnittlich bei Zusatz von DCH zum Medium (3 Perfusionen) dort an: in steilem Anstieg in der ersten Stunde auf das etwa 23-fache der Anfangs-Aktivitäten. Dann flacht die Kurve sich - etwa parallel zum Verhalten in KCN - wiederum ab und erreicht mit dem 80-fachen der Ausgangs-Aktivitäten nach der 4. Stunde ihr Maximum. Nur ENO, LDH und PK zeigen zwischen der 3. und der 4. Stunde einen leichten - nicht auskorrigierbaren - Aktivitäts-Rückgang. Das Enzym-Muster ist insofern aufgelockert, als sich die untere Gruppe nicht mehr deutlich von der Mittelgruppe absetzt. Erstaunlich ist wiederum der geringe Anstieg der GAPDH.

Weiterhin ist auffallend, daß schon nach 3 - 5 Minuten Perfusion, also bei der ersten Probe, GLDH im Medium gefunden wird, sie steigt trotzdem insgesamt nur auf das 4-fache dieses Ausgangs-Wertes an.

Den stärksten Anstieg fast aller Enzym-Aktivitäten bringt der Zusatz von DNP zum Perfusions-Medium (2 Perfusionen). Im Durchschnitt erreichen hier die Enzym-Aktivitäten nach der 1. Stunde das 50-fache, nach der 2. das 100-fache, nach der 3. das 150-fache und nach 4 Stunden am Ende der Perfusion etwa das 180-fache der Anfangs-Werte.

Das Enzym-Muster weist wiederum Besonderheiten auf: die GDH löst sich weit aus der Mittelgruppe nach oben, die Mittelgruppe ist ab der 2. Stunde in 2 Teile gesplittert, deren unterer vor allem solche Enzyme enthält, deren Aktivität nicht weiter ansteigt, bzw. abnimmt. Die GLDH ist wie bei DCH-Zusatz schon bei der ersten Messung nach 3 - 5 Minuten meßbar, sie zeigt aber als einziges Enzym wiederum keinerlei Tendenz, an der allgemeinen Beschleunigung des Austritts aus den Zellen weiter teilzunehmen (Anstieg nach 4 Stunden nur auf das 5-fache).

Ein eigenartiges Bild findet sich beim Zusatz von JAA zum Perfusions-Medium (2 Perfusionen). Hier ist der Anstieg in der 1. Stunde - außer dem von GLDH und ZF - nicht höher als bei Perfusion mit AT allein, d.h. durchschnittlich ebenfalls auf das 8-fache der Ausgangswerte. Auffallend ist in JAA jedoch eine hohe GAPDH-Aktivität im Medium bereits nach 5 Minuten-Perfusion. Nach der 1. Stunde setzt bei allen Enzymen außer der GLDH ein enormer Anstieg ein: sie steigen jetzt bis zur 2. Stunde auf über das 100-fache ihrer Ausgangs-Aktivität an. Bis zur 3. Stunde wird bei vielen Enzymen das Maximum mit durchschnittlich dem 150-fachen der Anfangs-Aktivität erreicht, in der 4. Stunde zeigen zahlreiche Enzyme keinen weiteren Anstieg oder sogar einen mehr oder weniger großen Abfall ihrer Aktivitäten.

Das Enzym-Muster ist dabei - von der absoluten Höhe abgesehen - gegenüber dem in AT nicht sehr verändert. Man hat den Eindruck, daß die toxische Schädigung, die sich auf die hypoxische aufpfropft, erst verspätet einsetzt, aber ähnlicher Natur ist.

3. Anstieg der Isozyme von MDH und GOT im Perfusions-Medium.

a. Der Einfluß der Dialyse auf die Enzym-Aktivitäten.

Da vor der chromatographischen Differenzierung der Isozyme eine mehrstündige Dialyse der Medium-Proben gegen 0,008 M Phosphat-Puffer eingeschaltet ist, war zunächst zu prüfen, welchen Einfluß diese Milieu-Änderung auf die Enzym-Aktivitäten hat, und ob ihr Effekt in den toxischen Medien ein anderer ist als in AT allein. Es war ja zu vermuten, daß evtl. durch Herausdiffundieren eines Teiles der niedermolekularen Gifte eine Wiederherstellung gehemmter Enzym-Aktivität (z.B. der GOT durch KCN) eintreten könne. Unsere Erfahrungen zeigen, daß das nicht der Fall ist, sondern daß sich die Aktivitäten von MDH und GOT in allen Medien im Laufe der Dialyse gleichsinnig und ohne wesentliche Streuung verändern. Dies ist für die verschiedenen Proben und für die Leberhomogenate in Tab. XII zusammenfassend dargestellt.

Tab. XII

Einfluß der Dialyse auf die Enzym-Aktivitäten

Enzym	im Medium				in der Leber	
	1 h	2 h	3 h	4 h	vor	nach
		nach			Perfusion	
GOT	91%	85%	84%	78%	92%	85%
MDH	96%	86%	84%	77%	120%	111%

Protein	98%				111%	
---------	-----	--	--	--	------	--

Angaben in % der Aktivität bzw. der Konzentration vor der Dialyse. Mittelwert aus jeweils 19 Untersuchungen

In allen Perfusions-Medien kommt es bei der Dialyse zu einer zunächst geringen und gut mit der minimalen, durch die Änderung der Protein-Konzentration ausgedrückten Verdünnung übereinstimmenden Abnahme der Aktivität beider Enzyme, die mit der Dauer der vorausgegangenen Perfusion diese zunehmend überschreitet, jedoch 25% nicht erreicht. Sie ist auch für beide Enzyme praktisch gleich.

In den Leberhomogenaten verhält sich die GOT wie in den Medien, die MDH zeigt indessen eine Aktivitäts-Steigerung, die nach der Perfusion mit der Konzentrations-Steigerung des Extrakt-Proteins übereinstimmt, vorher hingegen darüber hinausgeht. Sie ist gut mit der - allerdings bei höheren Temperaturen - bereits gezeigten Aktivitäts-Zunahme der MDH bei der Alterung in vitro in Einklang zu bringen und scheint somit kein spezieller Einfluß der Dialyse zu sein.

b. Isozyme im Medium.

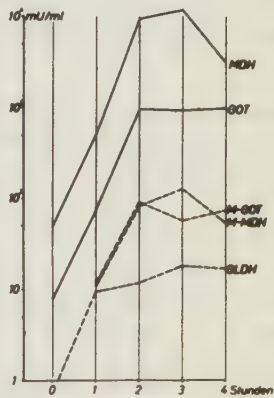
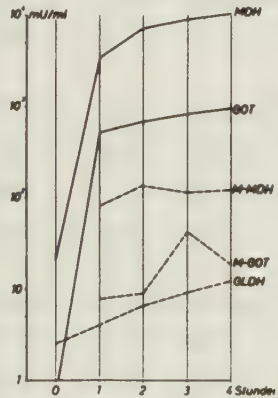
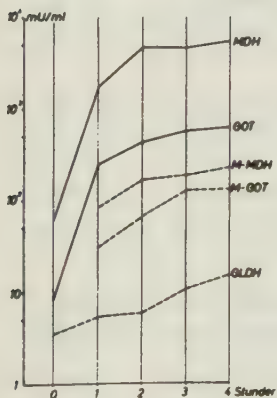
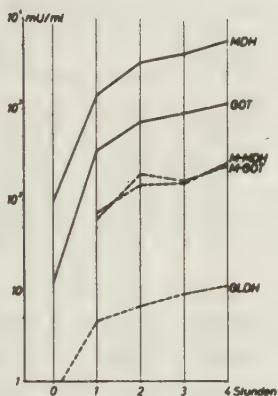
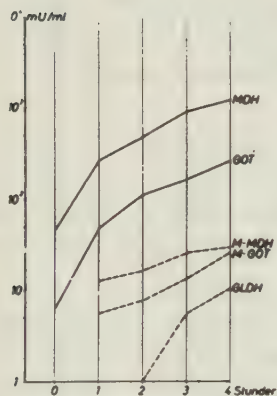
Der Austritt der mitochondrialen Isozyme von MDH und GOT, sowie der (mitochondrialen) GLDH in Relation zum Anstieg der Gesamt-Aktivitäten der beiden Enzyme ist in Abb. 5 dargestellt.

Abb. 5

Anstieg der mitochondrialen Isozyme von MDH und GOT verglichen mit den Gesamt-Aktivitäten beider Enzyme und der GLDH im Per-fusions-Medium im Verlauf der Perfusion mit AT und unter Zusatz von KCN, DCH, DNP und JAA bei 37°C. (Mittelwerte aus 2 - 6 Verläufen).

AT

KCN



DCH

DNP

JAA

Es geht daraus hervor, daß in allen Medien der Anteil der M-Isozyme an der extra-cellulär gefundenen Aktivität etwa eine Größenordnung niedriger liegt als der der cytoplasmatischen Isozyme. Unterschiede treten allerdings zwischen den verschiedenen Medien und ebenfalls zwischen MDH und GOT im gleichen Medium auf. Die absoluten Aktivitäten und die prozentualen Anteile der beiden M-Isozyme und der beiden C-Isozyme in den untersuchten Medien im Laufe der Perfusionen zeigt Tabelle XIII.

Tab. XIII

	Isozym-Aktivitäten von MDH und GOT im Perfusions-Medium							
	nach 1 h		nach 2 h		nach 3 h		nach 4 h	
	mU/ml	%	mU/ml	%	mU/ml	%	mU/ml	%
AT n = 6								
C-MDH	262,0	95,3	466,5	96,6	910,2	97,2	1.239,2	97,6
M-MDH	12,9	4,7	16,4	3,4	26,2	2,8	30,5	2,4
C-GOT	42,8	89,0	103,0	93,0	153,8	92,0	241,2	89,9
M-GOT	5,6	11,0	7,7	7,0	13,4	8,0	27,0	10,1
KCN n = 3								
C-MDH	1.366,8	95,0	3.135,4	95,5	3.965,6	96,2	5.508,0	95,4
M-MDH	72,0	5,0	149,0	4,5	156,6	3,8	257,5	4,6
C-GOT	290,4	82,6	547,3	74,0	747,1	81,6	947,8	79,4
M-GOT	61,1	17,4	192,0	26,0	188,0	18,4	243,0	20,6
DGH n = 2								
C-MDH	1.704,0	95,3	4.569,5	96,5	4.428,8	95,9	5.272,4	95,5
M-MDH	84,1	4,7	165,5	3,5	189,4	4,1	225,2	4,5
C-GOT	217,4	87,8	361,5	84,9	435,2	77,0	494,2	78,8
M-GOT	30,5	12,2	64,4	15,1	130,0	23,0	133,0	21,2
DNP n = 2								
C-MDH	3.347,2	97,6	7.174,9	98,1	8.888,0	98,7	10.233,6	98,8
M-MDH	82,4	2,4	139,0	1,9	117,0	1,3	124,1	1,2
C-GOT	519,2	98,5	683,9	98,7	793,5	95,0	940,9	98,0
M-GOT	7,9	1,5	9,0	1,3	41,7	5,0	19,2	2,0
JAA n = 2								
C-MDH	490,2	97,8	9.326,6	99,1	11.391,4	99,0	3.091,5	98,4
M-MDH	11,0	2,2	84,6	0,9	127,2	1,0	53,5	1,6
C-GOT	59,6	78,9	862,8	90,5	876,7	94,0	903,3	92,5
M-GOT	11,5	21,1	90,4	9,5	56,0	6,0	73,2	7,5

Bei der Perfusion mit AT als Medium ist bei beiden Enzymen der prozentuale Anteil der mitochondrialen Komponenten nach 1 Stunde am höchsten. Der M-Anteil an der Gesamt-Aktivität ist bei der GOT mit 7 - 11 % während der gesamten Perfusion mehr als doppelt so hoch wie der M-Anteil der MDH an deren Gesamt-Aktivität (2,4 - 4,7%). Dies ist bei der unterschiedlichen Isozym-Verteilung der beiden Enzyme in der Rattenleber auch nicht überraschend.

Bis zur 3. Stunde beträgt auch die absolute Aktivität der M-GOT nur etwa die Hälfte von der der M-MDH, erst in der 4. Stunde, in der der prozentuale Anteil der M-MDH weiter abnimmt, der der GOT jedoch ansteigt, finden sich nahezu gleiche absolute Aktivitäten beider mitochondrialen Isozyme.

Bei der Perfusion unter Zusatz von KCl sind die prozentualen Anteile der M-Isozyme bei beiden Enzymen am höchsten: der Anteil der M-MDH liegt zwischen 3,8 und 5%, der der M-GOT bedeutend höher zwischen 17 und 26%.

Die absoluten Aktivitäten beider M-Isozyme liegen während des ganzen Perfusions-Verlaufs ganz nah beieinander und etwa eine Größenordnung höher als bei der Perfusion mit AT allein. Der Unterschied in der Art der Zellschädigung kommt hier viel klarer zum Ausdruck als nur bei der Betrachtung des recht ähnlichen Gesamt-Aktivitäts-Musters.

Beim Zusatz von DCH zum Perfusions-Medium liegen die relativen Anteile der beiden M-Isozyme im gleichen Bereich wie beim Zusatz von KCl, nämlich für M-GOT zwischen 12 und 23% und für die M-MDH zwischen 3,5 und 4,5% der Gesamt-Aktivität.

Es finden sich somit auch ähnliche absolute M-MDH-Aktivitäten, jedoch nicht so hohe M-GOT-Aktivitäten, da unter DCH der Anstieg der GOT-Aktivität insgesamt deutlich geringer, der der MDH-Aktivität insgesamt etwas höher ist als bei Zusatz von KCl.

Noch weiter auseinander weichen die absoluten Aktivitäten der beiden M-Isozyme bei Zusatz von DAP. Die M-GOT-Aktivität verläuft während der ganzen Perfusion eine Größenordnung unterhalb der Aktivität der M-MDH, entsprechend den Relationen der Gesamt-Aktivitäten der beiden Enzyme zueinander, denn die

relativen Anteile der mitochondrialen Isozyme sind bei beiden Enzymen gleich gering, zwischen 1,5 und 5%. Hier ist also das Überwiegen der Schädigung des Cytoplasmas noch deutlicher als bei der Perfusion mit AT ohne Zusatz.

Dies gilt auch für das Verhalten der M-MDH beim Zusatz von JAA zum Medium: während auch hier die C-MDH enorm im Medium während der Perfusion ansteigt, beträgt der Anteil des M-Isozyms stets nur 1 - 2% ihrer Gesamt-Aktivität.

Der prozentuale Anteil der mitochondrialen GOT liegt hingegen zwischen 6 und 20%, sodaß die absoluten Aktivitäten beider M-Isozyme trotz der großen Differenz zwischen den entsprechenden C-Isozym-Aktivitäten sehr ähnlich sind.

Vergleicht man die verschiedenen Medien untereinander, so findet sich der absolut und vor allem relativ schwerste Schaden an den mitochondrialen Strukturen beim Zusatz von KCN. Danach folgt mit einem absolut zwar ebenso hohen, aber relativ geringeren Anstieg mitochondrialer Isozyme die Vergiftung mit DCH, während bei den Perfusionen mit DNP und JAA der enorme Enzym-Austritt aus dem cytoplasmatischen Raum in gar keinem Verhältnis zu der nur geringen Schädigung der Mitochondrien steht.

4. Veränderungen des Enzym- und Isozym-Musters in der Leber.

Tab. XIV

Enzym- und Isozym-Aktivitäten in der Rattenleber vor und nach Perfusion mit AT und unter Zusatz von KCN, DCH, DNP und JAA bei 37°C. (Mittelwerte aus 2 - 6 Perfusionen).

Enzym	vor Perfusion		nach AT		nach DCH		nach KCN		nach DNP		nach JAA	
	U/g Leber	mU/mg Protein	U/g Leber	mU/mg Protein	U/g Leber	mU/mg Protein	U/g Leber	mU/mg Protein	U/g Leber	mU/mg Protein	U/g Leber	mU/mg Protein
LDH	344,68	2690,08	365,36	4073,58	189,57	2348,48	368,81	4042,62	186,13	3378,65	17,23	305,60
MDH	377,38	2945,28	339,64	3786,02	184,92	2290,38	396,25	4988,04	256,62	4658,19	86,80	1539,55
GLDH	44,10	344,18	40,57	452,33	28,22	349,66	44,54	560,67	23,81	432,20	26,02	461,51
SDH	16,35	127,60	13,24	147,61	11,93	147,79	18,60	236,65	4,41	80,05	0,65	11,52
ADH	20,51	160,07	18,25	203,47	5,54	68,63	29,12	366,56	2,46	44,65	0,41	7,27
ICDH	19,17	149,61	18,98	211,61	3,26	40,38	24,34	306,39	4,92	90,39	1,15	20,39
EF	3,81	29,73	4,46	49,72	1,87	23,16	3,92	49,34	1,07	19,42	0,23	4,07
PCDH	2,30	17,95	2,44	27,20	0,62	7,68	3,50	44,05	0,62	11,25	0,37	6,56
PTA	6,65	51,90	6,65	14,14	4,85	60,08	7,58	95,41	3,26	59,17	1,93	34,23
ALD	8,25	64,38	7,59	84,62	3,71	45,96	8,50	106,99	0,99	17,97	0,99	17,55
GDH	34,84	271,91	30,31	337,94	20,90	258,91	38,67	486,78	5,57	101,10	2,09	37,05
PK	23,44	182,93	18,52	206,48	22,27	275,89	21,80	274,42	8,20	148,84	8,67	153,77
ENO	7,19	56,11	8,48	94,54	0,93	11,52	8,84	111,27	2,01	36,48	1,08	19,15
GOT	108,13	843,90	98,40	1097,11	57,31	709,98	116,78	1470,04	42,17	765,47	59,47	1054,80
GPT	14,80	115,50	11,99	133,68	12,43	153,98	14,94	188,06	4,00	72,60	4,59	81,41
PGK	155,43	1213,06	132,11	1472,96	164,75	2041,00	184,96	2328,29	31,09	564,34	13,99	248,13
GLPDH	105,57	823,92	97,12	1082,84	26,39	326,93	135,13	1701,03	11,61	210,74	2,11	37,42
Protein	128,13	-	89,69	-	80,72	-	79,44	-	55,09	-	56,38	-
Isozyme												
C-GOT	22,71	-	18,70	-	6,30	-	12,84	-	3,37	-	7,73	-
M-GOT	85,42	-	79,70	-	51,01	-	103,94	-	38,80	-	51,74	-
C-MDH	233,97	-	210,58	-	57,33	-	142,65	-	136,01	-	26,91	-
M-MDH	143,40	-	129,06	-	127,59	-	253,60	-	120,61	-	59,89	-

Nach der Perfusion mit AT als Medium ist der Extrakt-Protein-Gehalt der Leber um durchschnittlich 30 % gesunken, die Enzym-Aktivitäten verringern sich aber - bezogen auf Leber-Frischgewicht - ausnahmslos weniger, durchschnittlich um 10 % ihrer Ausgangs-Aktivität. (Abb. 6).

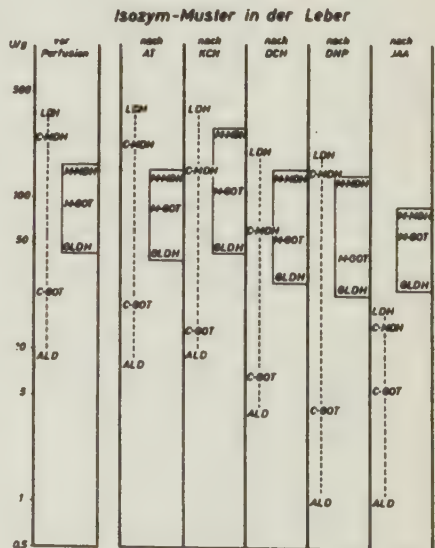
ICDH und PFA-Aktivitäten bleiben gleich, ENO, LDH, PGDH und ZF-Aktivitäten weisen Anstiege zwischen 6 und 18 % auf. Die spezifische Aktivität in der Leber steigt somit bei allen untersuchten Enzymen.

Das Isozym-Verhältnis der LDH ändert sich unter der Perfusion nicht, während sich bei der GOT eine gering stärkere Abnahme des cytoplasmatischen Isozyms findet (Abb. 7)

Abb. 6



Abb. 7



Nach der Perfusion unter Zusatz von KCN zum Medium finden sich eigentümliche Veränderungen in der Leber. Der Extrakt-Protein-Gehalt sinkt etwas mehr ab als unter AT allein, nämlich um 38 %. Abgesehen steigt die Aktivität fast aller Enzyme, - bezogen auf Leber-Frischgewicht - an. Die PK nur sinkt um 7 % ab, ALD, GLDH, ZF und ZF bleiben unverändert. Den höchsten Anstieg mit +52 %

hat die PGDH, der durchschnittliche Anstieg liegt um +15 %. Die spezifische Aktivität steigt demnach bei allen Enzymen deutlich an, durchschnittlich auf mehr als das Doppelte (Abb. 6).

Die Isozyme von MDH und GOT dissonieren in ihrem Verhalten: der Anstieg der Gesamt-Aktivität rührt bei beiden Enzymen allein von der Zunahme der M-Isozyme her. Relativer Anteil und absolute Aktivität der M-MDH verdoppeln sich nahezu, nämlich von 38 %, bzw. 143 U/g auf 64 %, bzw. 254 U/g. Der relative Anteil der GOT steigt ebenfalls von 70 % auf 89 % und damit die absolute Aktivität von 85 U/g auf 104 U/g. Die beiden cytoplasmatischen Isozyme fallen dagegen auf etwa 30 % ihrer Ausgangs-Aktivitäten ab (Abb. 7).

Nach der Perfusion unter Zusatz von DCM zum Medium fällt das Extrakt-Protein wiederum um 37 % in Mittel ab. Anders als bei Zusatz von MCM fällt aber die Aktivität aller Enzyme außer der der PGH ebenfalls ab. Die Enzym-Verluste streuen weit mehr als bei der Perfusion mit AT allein: die stärkste Verminderung, nämlich um 87 %, findet sich bei der LDH, auch ADH, GAPDH, ICDH und PGDH sinken stark ab. Die Abnahme der Enzym-Aktivitäten ist mit -47 % in Mittel größer als die des Extrakt-Proteins (Abb. 6). So ist auch die spezifische Aktivität mit Ausnahme von GLDH, GPT, PTA, PGA, PK und SGL verringert.

Die beiden Isozyme von MDH und GOT werden von der Aktivitäts-Abnahme in unterschiedlichen Maße betroffen: die C-Isozyme bei-der Enzyme fallen auf ca. 25 % ihrer Ausgangs-Aktivität. Ihr Anteil sinkt bei der MDH von 61 % auf 31 %, bei der GOT von 21 % auf 11 %.

M-MDH nimmt dagegen nur um 10 % ihrer Ausgangs-Aktivität ab, M-GOT um 40 %, sie differieren also, anders als die C-Isozyme in ihrem Verhalten gegenüber der Schädigung (Abb. 7).

Nach der Perfusion unter Zusatz von DLP zum Medium sind die Veränderungen in der Leber noch stärker ausgeprägt. Der Verlust von Extrakt-Protein ist hier am größten, nämlich über 60 %. Die mittlere Abnahme der Enzym-Aktivitäten ist sogar noch stärker, sie beträgt fast 70 %.

Weniger als das Extrakt-Protein nehmen GLDH, GOT, LDH, MDH und PTA ab, ihre spez. Aktivität steigt also an, am meisten bei

MDH (+84 %). Die stärksten Verminderungen finden sich bei ADH, ALD, GAPDH und GDH, bei denen weniger als 20 % ihrer Anfangs-Aktivität erhalten bleiben (Abb. 6).

An der erheblichen Abnahme der GOT-Aktivität (auf ca. 40 % der Anfangs-Aktivität) sind beide Isozyme beteiligt, wenn auch das cytoplasmatische Isozym mit 85 % Verlust deutlich mehr als das mitochondriale mit 55 % Verlust. Die LDH ist insgesamt weniger vermindert, die M-LDH sogar nur um 16 %, die C-LDH um etwas mehr als 40 %. In diesem Medium weicht also nicht nur das Verhalten der beiden M-Isozyme voneinander ab, sondern auch das der C-Isozyme, die bisher in engen Grenzen gleichmäßig abnahmen (Abb. 7).

Nach der Perfusion mit Zusatz von JAA zum Medium finden sich excessive Abnahmen der Enzym-Aktivitäten in der Leber, obgleich hier das Extrakt-Protein nur um 56 % verringert gefunden wird. Die durchschnittliche Aktivitäts-Abnahme - bezogen auf Feuchtwicht - beträgt in JAA 82 %. Nur bei GLDH und GOT, den beiden überwiegend mitochondrialen Enzymen, ist noch mehr als die Hälfte der Ausgangs-Aktivität erhalten, die spezifische Aktivität also erhöht.

Die geringsten Rest-Aktivitäten weisen mit weniger als 5 % der Anfangsaktivität ADH, GAPDH, ICDH und SDH auf (Abb. 6).

Die LDH und die GOT sind in beiden Isozym-Anteilen stark vermindert und zwar hier - anders als unter DMP - die LDH mehr als die GOT, entsprechend dem Verhalten der Gesamt-Aktivitäten. Die C-LDH erfährt einen maximalen Verlust von fast 90 %, von der M-LDH ist weniger als die Hälfte noch vorhanden. Die Aktivität der C-GOT ist noch zu 25 %, die der M-GOT zu 60 % erhalten (Abb. 7).

Diskussion

Die isolierte und in gleicher oder ähnlicher Weise wie beschrieben perfundierte Rattenleber wurde und wird in Stoffwechsel-Untersuchungen als ein Modell angesehen, aus dessen Reaktionsweisen unmittelbare Schlüsse auf das Normal-Verhalten der Leber in vivo gezogen werden können. Da bei Fragestellungen, die die regulatorischen, synthetischen und sekretorischen Leistungen der Leber betreffen, das große Organ in seiner Gesamtheit erfaßt wird, nimmt es bei seiner riesigen Reserve-Kapazität, die ja auch aus der Leber-Pathologie bekannt ist, nicht wunder, daß merkliche Einschränkungen dieser Fähigkeiten bei gut ausgewogenen Perfusions-Bedingungen erst spät eintreten. Unter diesen Aspekten ist die isolierte perfundierte Leber also in vieler Hinsicht als ein überlebendes funktionstüchtiges Organ anzusehen.

Betrachtet man jedoch sein Überleben und die Aufrechterhaltung der Funktion nicht von der Gesamtheit her, sondern in Hinblick auf die Einzelzellen, so wird das Bild des intakten Organs einigermaßen getrübt: vom Beginn der Perfusion an und in zunehmendem Maße sind die Leberzellen nicht mehr fähig, ihre Grenzflächenabdichtung aufrecht zu erhalten.

Schimmassek (51) und Schmidt, Schmidt und Herfarth (37) fanden auch bei Perfusionen mit Erythrocyten-haltigen, hoch O_2 -gesättigten Medien und unter physiologischen Drucken innerhalb von 4 Stunden einen Anstieg von Enzymen des energie-liefernden Stoffwechsels im Perfusions-Medium auf das 4 - 10-fache der Ausgangs-Werte wenige Minuten nach Beginn. Dabei blieben zahlreiche andere Funktionen der Leber, wie z.B. die Aufrechterhaltung des Lactat-Pyruvat-quotienten u. des Blut-Glucose-Spiegels und die Produktion von Galle, noch voll erhalten. Diese Schädigung, die sich im Enzym-Verlust aus den Zellen manifestiert, ist hier sicher keine Folge mangelnder Sauerstoff-Versorgung der Zellen, ihre Ursache ist noch unklar, möglicherweise tritt in den wenigen Minuten, in denen die Zirkulation in der Leber stagniert, ein solcher Energie-mangel ein, daß die überlebende Leber ihn nicht wieder kompensieren kann, oder die Zusammensetzung auch der Erythrocyten-haltigen und soweit es den

Gehalt an Mineralien angeht, physiologischen Perfusions-Lösungen ist bezüglich veratembarer Substrate unzulänglich.

Indessen führt die Perfusion mit Erythrocyten-freien Medien, wie sie in den hier beschriebenen Versuchen angewandt wurde, auch bei O_2 -Drucken in der V. portae von 250 - 300 Torr. und einer ΔV -Differenz zwischen V. portae und V. cava von 100 - 200 Torr. zu einer deutlichen Beschleunigung des Enzym-Austritts aus der Leber. Nach 4 Stunden erreichen die Enzym-Aktivitäten im Kreislauf bei Perfusion mit AT durchschnittlich die dreifache Höhe wie in einem Blut-Medium.

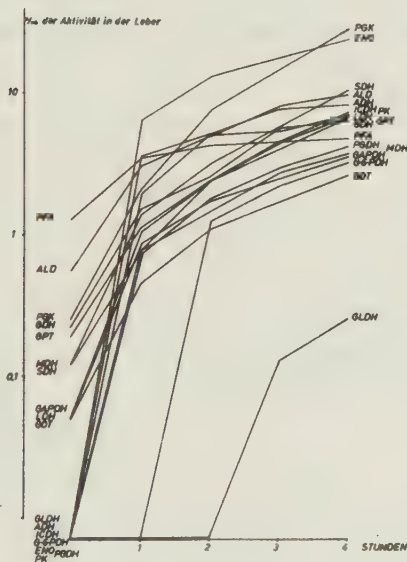
Analysiert man das in diesem Medium auftretende Enzym-Muster, das sich, wie Abb. 4 Bild 1, zeigt, von Beginn an in drei Gruppen von Enzymen spaltet, so zeigt sich, daß die obere Gruppe erwartungsgemäß drei Enzyme mit hohen Aktivitäten im Leber-Gewebe enthält, also mit einem steilen Konzentrations-Gefälle zum Extracellulär-Raum hin. Die untere Gruppe umfaßt die beiden Enzyme des Hexose-Monophosphat-Zyklus, deren Aktivitäten in der Leber klein sind. Auch die beiden Aldolasen, die den unteren Rand der Mittelgruppe bilden, können zu den Enzymen mit geringem Konzentrations-Gefälle gerechnet werden.

Dies trifft aber nicht auf die erst spät und nur sehr wenig im Kreislauf ansteigende G6PD zu.

Ihre Sonderstellung bleibt auch erhalten, wenn man die Enzym-Aktivitäten im Perfusions-Medium auf ihre jeweilige Aktivität in der Leber bezieht, wie es in Abb. 8 geschehen ist.

Abb. 8

Anstieg von Enzym-Aktivitäten im Perfusions-Medium während der Perfusion mit AT bei 37°C, bezogen auf den jeweiligen Gehalt in der Leber.



Angaben in % der Aktivität in der Leber.

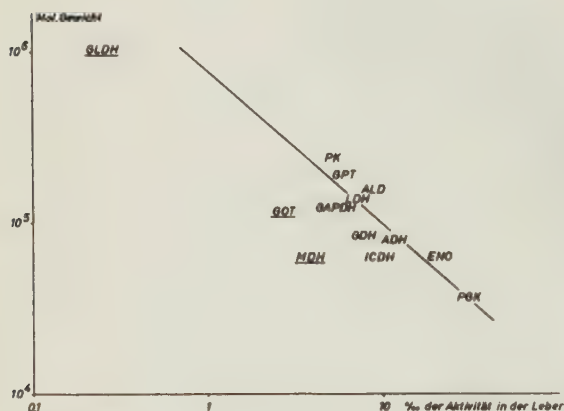
Die meisten anderen Enzyme rücken aber beim Bezug auf den Gehalt in der Leber in die Mittelgruppe ein, verhalten sich also entsprechend ihrem Konzentrations-Gefälle.

Es liegt nahe, den geringen Anstieg der GLDH auf ihr außerordentlich hohes Molekulargewicht von $\sim 10^6$ zu beziehen, zumal die beiden Enzyme Enolase und Phosphoglycerat-Kinase, die einen höheren Anstieg im Extracellular-Raum aufweisen, als es ihrer Aktivität in der Leber entspricht, sich durch niedrige Molekulargewichte auszeichnen.

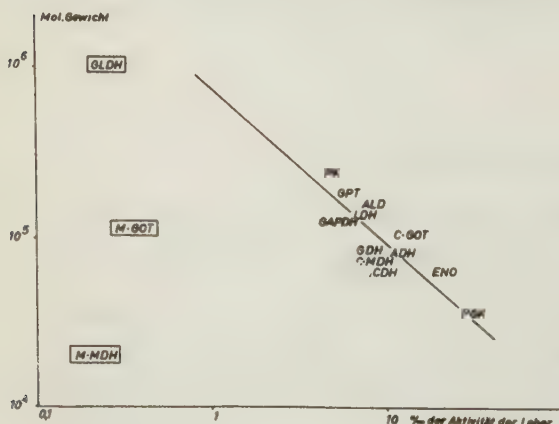
Ordnet man die Enzym-Aktivitäten, wie man sie nach vierstündiger Perfusion bei 37°C im Perfusions-Medium AT findet, nach ihren Molekular-Gewichten, soweit sie uns annähernd bekannt sind, so ergibt sich das Bild der Abb. 9a.

Abb. 9

Beziehung zwischen dem Molekular-Gewicht der Enzyme und ihrem Anstieg im Perfusions-Medium nach 4-stündiger Perfusion mit AT bei 37°C.



9a
ohne Berücksichtigung
der intra-cellulären
Lokalisation



9b
mit Berücksichtigung
der intra-cellulären
Lokalisation

Aktivitäten in % der Aktivität in der Leber.

Demzufolge ist nach dem Konzentrations-Gefälle Gewebe - Kreislauf das Molekular-Gewicht der Enzym-Proteine für ihre Austritts-Geschwindigkeit aus den Zellen bestimmend.

Aus Abb. 9a geht jedoch hervor, daß bei drei der untersuchten Enzyme - GLDH, GOT und LDH - ein weiterer Faktor wirksam sein muß, der ihren Austritt aus den Zellen bei dieser Schädigung verzögert.

Es ist dies ihre intra-celluläre Lokalisation: GLDH ist zu 100 %, GOT zu über 75 % und LDH zu fast 40 % in den Mitochondrien der Rattenleber lokalisiert (Tab. V). Der weit überwiegende Teil der im Medium nachweisbaren Aktivitäten von GOT und LDH besteht aus ihren cytoplasmatischen Isozymen (Abb. 5, Tab. XIII). Diese cytoplasmatischen Anteile steigen, wie Abb. 9b zeigt, im Perfusions-Medium ebenso wie die anderen Cytoplasma-Enzyme ihren Konzentrations-Gefälle und ihrem Molekular-Gewicht entsprechend an.

Die mitochondrialen Isozyme hingegen zeigen unabhängig von ihrer Aktivität in der Leber und ihren - allerdings unsicheren Molekular-Gewichten - die gleichen geringen Austritts-Raten wie die mitochondriale GLDH.

Für die hypoxische Schädigung der Leber bei der Perfusion mit AT ist also mit dem Bezug auf die drei Faktoren: Konzentrations-Gefälle, Molekular-Gewicht und intra-celluläre Lokalisation eine recht befriedigende - gewissermaßen physikalische - Beschreibung der Entstehung des extra-cellularen Enzym-Musters möglich.

Damit, daß die mitochondrialen Enzyme und Isozyme sich nicht wie die cytoplasmatischen den eben genannten Voraussetzungen gemäß verhalten, wird auch offenbar, daß die im Perfusions-Medium auftretenden Enzym-Aktivitäten nur zu einem ganz geringen Teil aus Zell-Nekrosen stammen. Das Enzym-Muster in AT ist nur, soweit es die Enzyme des cytoplasmatischen Raumes betrifft, leberähnlich, die übrigen Relationen sind erheblich verzerrt. Es handelt sich also um eine zwar ausgebreitete, aber nur mäßig schwere Schädigung der Leberzellen.

Daß die Zellschädigung im Einzelnen nicht so groß ist, zeigt sich auch an der sehr geringen Veränderung des Enzym-Musters in der Leber während der Perfusion mit AT. Die von anderen Schädigungen her bekannte und für die entzündlichen Leberkrankheiten typische Aktivitäts-Steigerung von ZF und PGDH findet sich auch hier, hingegen tritt die z.B. bei der akuten Hepatitis ausgeprägte Einschmelzung des enzymatischen Überbaus für spezifische Leistungen (ADH, GDH, GPT, PFA und SDH) nicht hervor. Hierfür ist möglicherweise nur die kurze Zeitdauer der Schädigungswirkung verantwortlich. Die ohnehin träge und meist gemeinsam veränderlichen Enzyme der glykolytischen Hauptkette zeigen ebenfalls nach der Perfusion kaum einen Unterschied zu ihren Ausgangs-Werten.

Die deutlich über die Verschiebungen der Enzym-Aktivitäten hinausgehende Abnahme des Extrakt-Proteins, die zu einer allgemeinen Zunahme der spezifischen Aktivität führt, könnte mit einer vermehrten Wasseraufnahme der Zellen erklärt werden. Wägungen der Lebern vor und nach der Perfusion lassen aber keine Gewichtszunahme des Organs erkennen. Möglicherweise verliert die Leber in erhöhtem Maße labiles Protein, oder eher Protein-Bruchstücke, die zwar mit der Biuret-Reaktion faßbar sind, nicht aber in ihrem Verhalten beim Austritt aus den Zellen mit den hochmolekularen Enzym-Proteinen parallel gehen.

Vergleicht man den Enzym-Austritt bei der Perfusion mit AT mit den Versuchen, bei denen noch eine zusätzliche toxische Schädigung erfolgte, so scheint auf den ersten Blick die Hoffnung, völlig verschiedene extra-celluläre Enzym-Muster durch die toxischen Schäden zu erzielen, zu trügen: die Unterschiede sind primär vor allem gradueller Natur. Die 5 Graphiken der Abb. 4 zeigen alle einen zunächst steilen, dann sich abflachenden Kurvenverlauf, und auch die Stellung der einzelnen Enzyme innerhalb der Gruppen erscheint zunächst sehr ähnlich.

Eine eingehendere Betrachtung unter Einbeziehung der Isozym-Differenzierung läßt aber schnell erkennen, daß die extra-cellulär auftretenden Enzym-Muster bei den verschiedenen Giften doch recht unterschiedlich sind. Diese Unterschiede sind am

und der mitochondrialen Enzyme und Isozyme zueinander eine gute Stütze der Vorstellungen über die Angriffspunkte der beiden Gifte.

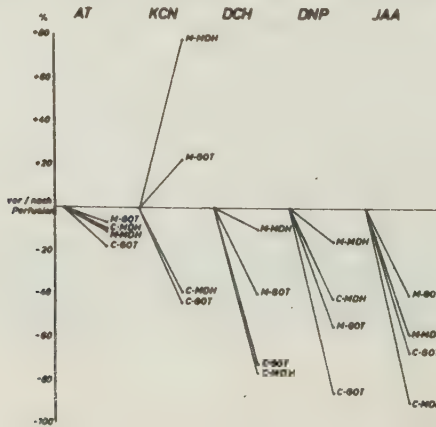
Da KCN die End-Oxydation auf der Stufe der Cytochrome hemmt, ist es nicht verwunderlich, daß bei der Perfusion mit KCN die Mitochondrien die weitaus schwerste Schädigung zeigen, die sich durch den gegenüber JAA um eine Größenordnung höheren relativen Austritt von Mitochondrien-Enzymen dokumentiert.

Da Enzyme der End-Oxydation nicht gemessen wurden, kann das untersuchte Enzym-Spektrum nur Sekundär-Effekte des KCN widerspiegeln, (die auch in vitro nachweisbar Hemmung der Transaminasen ausgenommen). Hypothetisch ließe sich diskutieren, daß der Steigerung fast aller Enzym-Aktivitäten ein kompensatorisches Eintreten glykolytischer und mit der Glykolyse zusammenwirkender Stoffwechselwege für die blockierte Atmung zu Grunde liegt.

So würde auch der scheinbare Widerspruch in der eigenartigen Zunahme der Aktivitäten von M-GOT und M-MDH in der Leber (Abb. 11) trotz ihres nicht unerheblichen Anstieges im Kreislauf eher begreiflich. Es wird ja angenommen, daß sie mit den cytoplasmatischen Anteilen beider Enzyme in Zyklen wirksam sind, die die beiden großen Zell-kompartimente metabolisch miteinander verbinden (36).

Abb. 11

Veränderungen der Isozym-Aktivitäten von MDH und GOT in der Leber nach der Perfusion mit AT und unter Zusatz von KCN, DCH, DNP und JAA bei 37°C.
(Angaben in % der Aktivitäten vor Perfusions-Beginn).



Der auffallendste Befund bei der Perfusion unter Zusatz von JAA ist demgegenüber nicht das Enzym-Muster im Perfusions-Medium, sondern neben der Höhe des Anstiegs der Enzym-Aktivitäten sein verspätetes Minsetzen. Es darf als sicher angenommen werden, daß in der normalen Leber der Durchsatz durch den Embden-Meyerhof-Weg nicht von den Hexose-Phosphaten zum Pyruvat, sondern überwiegend in umgekehrter Richtung verläuft, so mehr der Synthese als dem Energie-Aufkommen dient, und daß erst bei Eintritt einer Schädigung die Leber ihren Energie-Bedarf aus der Metabolisierung von Zuckern zu decken beginnt.

Da JAA die Glykolyse auf der Stufe der Triosephosphate hemmt, so ist demnach eine einschneidende Wirkung auf die strukturerhaltenden Funktionen der Leberzelle von JAA erst dann zu erwarten, wenn dort ein wesentlicher Teil der hierfür verfügbaren Energie auch entsteht. Der gegenüber AT und den übrigen Giften atypische Verlauf des Enzym-Anstiegs im Medium bei Zusatz von JAA fand so eine hypothetische Erklärung darin, daß es zunächst durch ein unzureichendes Angebot physiologischer Substrate zu einer Umkehr der Stoffwechselrichtung kommt, der dann erst als zweiter Schritt die Vergiftung der Glykolyse mit der schweren Störung der Grenzflächen-Abdichtung folgt, sodaß der cytoplasmatische Raum der Leberzellen über 80 % seines Enzym-Bestandes verliert (Abb. 6 und Abb. 11).

Diese Auswaschung hat eine solche Abflachung des Konzentrationsgefälles Leber/Kreislauf zur Folge, daß in den letzten beiden Stunden der Perfusion mit AT praktisch kein Enzym-Austritt mehr möglich ist. (Das Konzentrations-Gefälle der LDH sinkt z.B. von ca. 5000 : 1 zu Beginn der Perfusion auf 2 : 1 nach der 2. Stunde und ist nach drei Stunden nur noch unmerklich).

Am Beispiel der Perfusion mit AT konnten einige wesentliche Faktoren, die den Austritt von Enzymen aus der Leber beeinflussen, erläutert werden, an den beiden Vergiftungen mit KCN und JAA wurde versucht, mögliche toxisch und metabolisch bedingte Modifikationen, die zu verschiedenen extra-cellulären Enzym-Mustern führen, zu diskutieren. Die beiden anderen Gifte, deren Effekt untersucht wurde, über deren Angriffspunkte in der Zelle aber weit weniger bekannt ist, liegen in ihrer Auswirkung auf den Enzym-Austritt zwischen den beiden Extremen.

Es ist in dieser Arbeit nicht möglich, auf die Beziehungen zum histologischen Bild der Leber nach der Perfusion und unter den verschiedenen Vergiftungen, auf die dazugehörigen elektronen-optischen Untersuchungen und die Befunde über die Veränderungen der Glucose-, Lactat- und Pyruvat-Konzentration im Perfusions-Medium einzugehen. Sie werden nach Beendigung aller Studien, in deren Rahmen auch die beschriebenen Versuche gehören, erörtert werden.

Abschließend sei jedoch noch auf den zunächst überraschenden Umstand hingewiesen, daß keines der verwandten Stoffwechselgifte das Enzym-Muster in der Leber und das Enzym-Muster im Extracellular-Raum so verändert, wie es die Schädigung bei der akuten Hepatitis tut, auch dann nicht, wenn man die Verschiedenheit der normalen Enzym- und Isozym-Muster von Ratte und Mensch dabei berücksichtigt.

Ein Grund hierfür liegt sicher in der erheblich verschiedenen Ablauf-Geschwindigkeit: bei der Perfusion erreicht die Schädigung in wenigen Stunden ein Maximum - die akute Hepatitis braucht Tage und Wochen, um ihren Höhepunkt zu erreichen.

Weiterhin unterliegt die isolierte Leber bei der Perfusion keiner regulatorischen extra-hepatischen Kontrolle mehr im Gegensatz zur Leber in vivo bei der Hepatitis, und es ist gezeigt worden, wie stark neuro-hormonale Faktoren den Auswirkungsgrad von Schädigungen auf die Leber modifizieren können (39 - 42).

Schließlich setzen bekanntermaßen im Verlauf der Hepatitis frühzeitig entzündliche und regeneratorische Vorgänge ein. Es handelt sich also dort nicht nur um ein reines Schädigungsbild, sondern wie aus zahlreichen - auch metabolischen - Indizien hervorgeht, um die Überlagerung von Zell-Schädigung und Zell-Reaktion.

Trotz dieser Einschränkungen haben die Modell-Versuche am isolierten Organ unter artefiziellen Bedingungen, wie die Ergebnisse dieser Studie zeigen, ihre Berechtigung auch in Hinblick auf den Nutzen für die Human-Pathologie, und zwar dadurch, daß sie Einzelfaktoren, die den Enzym-Austritt aus der Leber maßgeblich bestimmen, aufdecken, und damit die sehr komplexen Vorgänge, die dabei und erst recht bei eigentlichen Erkrankungen der Leber ablaufen, allmählich einer Analyse zugänglich machen.

Zusammenfassung.

Am Modell der isolierten perfundierten Rattenleber wurde der Austritt von 17 Enzymen des energie-liefernden Stoffwechsels in das Medium und ihre Aktivitäts-Änderungen in der Leber studiert. Durch die Bestimmung von Enzymen und Isozymen unterschiedlicher cellulärer Lokalisation und durch Zusatz von verschiedenen Stoffwechselgiften wurde versucht, Aufschlüsse über die Mechanismen des Enzym-Austritts aus den Zellen zu erhalten. Ausgedehnte Voruntersuchungen galten den Einflüssen der Verdünnung, der verwandten Stoffwechselgifte und der Alterung der Enzyme im Medium.

Die Ergebnisse zeigen, daß bei Perfusion mit Albumin-Tyrode-Lösung die drei Faktoren: Konzentrations-Gefälle, Molekulargewicht und intra-celluläre Lokalisation eine befriedigende Erklärung des Enzym-Austritts und des Enzym-Austers im Perfusions-Medium ermöglichen. Unter Zusatz von Stoffwechselgiften kommt es zu deutlichen qualitativen und quantitativen Veränderungen des Enzym-Austers im Medium, wobei KCN zu einer relativ schweren Schädigung der Mitochondrien, JAA nach einer Latenz-Phase zu einem stärkeren Austritt cytoplasmatischer Enzyme führt. Bei JAA-Zusatz ist der Enzym-Austritt so stark, daß das Konzentrations-Gefälle Leber/Perfusions-Medium um drei Größenordnungen sinkt. Die beiden anderen untersuchten Gifte liegen in ihren Auswirkungen auf den Enzym-Austritt zwischen diesen beiden Extremen.

Keines der so erzielten Enzym-Auster im Medium gleicht dem Serum-Auster bei menschlicher akuter Hepatitis. Der Grund hierfür ist sicherlich im wesentlich protrahierteren Ablauf der Erkrankung zu suchen. Eher bestehen Ähnlichkeiten zu den Bildern bei schweren Vergiftungen.

Herrn Prof. Dr. F. Hartmann bin ich zu großem Dank für die Möglichkeit der wissenschaftlichen Arbeit an der Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg verpflichtet.

Herrn Priv. Doz. Dr. F.W. Schmidt danke ich für die Überlassung des Themas und ihm sowie Frau Dr. E. Schmidt für die Einarbeitung in die Methodik und für die stetige Unterstützung der Arbeit.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Ch. Herfarth, sowie Frau K. Schmidt, Fräulein R. Brandes und Fräulein R. Achelis für ihre jederzeit gern gewährte Hilfe.

Literatur-Verzeichnis

1. Warburg, O. u. W. Christian
Biochem. Z. 314, 399 (1943)
2. Merrill, J.M., J. Lemley-Stone, J.T. Grace a. G.R.Meneely
J. amer. Med. Ass. 160, 1454 (1956)
3. Zelman, S. a. Ch. Wang
Amer. J. Med. Sci. 237, 323 (1959)
4. Molander, D.W., F. Wroblewski a. J.S. LaDue
J. Lab. clin. Med. 46, 831 (1955)
5. Bruns, F.H. u. J. Neuhaus
Arch. Biochem. 55, 588 (1955)
6. Bruns, F.H., E. Brosswitz, H. Dannemann, H.D. Horn u.
Klin. Wschr. 39, 342 (1961) (E. Noltman)
7. Savranoglu, N., R.J. Bouce a. G.G. Casten
Am. Heart J. 58, 726 (1959)
8. Richter, K. u. K. Konitzer
Klin. Wschr. 38, 998 (1960)
9. Vetter, K., H. Griesche u. K. Moch
Z. ges. inn. Med. 17, 359 (1961)
10. Baumann, P., J. Escher u. R. Richterich
Schweiz. Z. Sportmed. 10, 33 (1962)
11. Critz, J.B. a. A.W. Merrick
Proc. Soc. exp. Biol.(N.Y.) 109, 608 (1962)
12. Fowler, W.M., S.R. Chowdhury, C.M. Pearson, G. Gardner a.
J. appl. Physiol. 17, 943 (1962) (R. Bratton)
13. Otto, P., E. Schmidt u. F.W. Schmidt
Klin. Wschr. 42, 75 (1964)
14. Schmidt, E. u. F.W. Schmidt
Klin. Wschr. 38, 957 (1960)
15. Löhr, G.W.
Folia haematol. 6, 49 (1961)
16. Delbrück, A., H. Schimmassek, K. Bartsch u. Th. Bücher
Biochem. Z. 331, 297 (1959)
17. Wroblewski, F.
Progr. Cardiovasc. Dis. 6, 63 (1963)
18. Schmidt, E., F.W. Schmidt u. Ch. Herfahrt
Klin. Wschr. 40, 1133 (1962)

19. Pette, D., W. Luh u. Th. Bücher
Biochem. biophys. Res. Comm. 7, 419 (1962)
20. Pette, D., M. Klingenberg u. Th. Bücher
Biochem. biophys. Res. Comm. 7, 425 (1962)
21. Klingenberg, M. u. D. Pette
Biochem. biophys. Res. Comm. 7, 430 (1962)
22. Schmidt, E. u. F.W. Schmidt
Enzymol. biol. clin. 3, 73 (1963)
23. Reith, A., J. Möhr, E. Schmidt, F.W. Schmidt u. E. Wildhirt
Klin. Wschr. 42, 909 (1964)
24. Amelung, D.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 318, 219 (1960)
25. Neuhaus, G., J. Bennhold, M. Kessel u. H. Weller
Klin. Wschr. 41, 619 (1963)
26. Bücher, Th., E. Schmidt u. F.W. Schmidt
Serum patterns of "key-pathway" enzymes. Ninth middle East
Med. Assembly 8.-10. Mai 1959 (Beirut)
27. Schmidt, E. u. F.W. Schmidt
Bibl. gastroenterol. 4, 15 (1961)
28. Schmidt, E. u. F.W. Schmidt
Regensbg. Jb. ärztl. Fortbildung XII, 207 (1964)
29. Schmidt, F.W.
Verhdlg. Dtsch. Ges. inn. Med. LXX, 612 (1964)
30. Miller, L.L., C.G. Bly, M.L. Watson a. W.F. Ball
J. exper. Med. 94, 431 (1951)
31. Schimmassek, H.
Life Sci. 11, 629 (1962)
32. Schimmassek, H.
Life Sci. 11, 635 (1962)
33. Schimmassek, H.
Biochem. Z. 336, 460 (1963)
34. Schimmassek, H.
Biochem. Z. 336, 468 (1963)
35. Schmidt, E. u. F.W. Schmidt
Enzymol. biol. clin. 2, 201 (1962)
36. T.E. Weichselbaum
Amer. J. clin. Path. 10, 40 (1946)

37. Schmidt, E., F.W. Schmidt u. Ch. Herfarth
unveröffentlichte Untersuchungen
38. Pette, D.
Habilitationsschrift, Universität Marburg/Lahn, 1963
39. McLean, A.E.M.
Nature, London, 185, 191 (1960)
40. McLean, A.E.M.
Nature, London, 185, 936 (1960)
41. Rees, K.R.
Ciba Foundat. Symp. on Enzymes a. Drug action.
Ed. A.V.S. de Reuck, Boston, 1962, p. 350
42. Calvert, D.N. a. T.M. Brody
Amer. J. Physiol. 198, 669 (1960)

Lebenslauf

Am 27. Oktober 1939 wurde ich als Sohn des Apothekers Kurt Möhr und seiner Ehefrau Irmgard, geb. Böttner, in Shanghai, China, geboren. 1941 kehrten meine Eltern nach Deutschland zurück. In Bremen bestand ich am 10. Februar 1959 die Reifeprüfung auf dem mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweige des Gymnasiums am Barkhof. Da mein besonderes Interesse schon immer der Biologie gegolten hatte, begann ich im Sommersemester 1959 an der Philipps-Universität in Marburg das Studium der Medizin. Nach im August 1961 bestandener Ärztlicher Vorprüfung setzte ich mein Studium für zwei Semester an der medizinischen Fakultät der Universität Montpellier fort. Zum Wintersemester 1962 kehrte ich nach Marburg zurück und begann in der Medizinischen Universitäts Poliklinik unter Leitung von Doz. Dr. med. F.W. Schmidt und Dr. E. Schmidt Enzymverteilungen in menschlichen und tierischen Lebern sowie den Enzymaustritt aus isolierten perfundierten Ratten-Lebern zu studieren. Letztere werden in der vorliegenden Dissertation dargestellt. Die Ärztliche Prüfung habe ich am 2. März 1965 bestanden.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

in Marburg

Beckmann, Berendes, Dickel, Braun-Falco, Bücher, Dimroth, Dölle, Drawert, du Mesnil de Rochemont, Exner, Förster, Gedigk, Mamm, Hartmann, Hensel, Hildebrandt, Heuser, Hornung, Huber, Knauff, Lang, Linneweh, Löhr, Mehr, Martini, Marx, Mattes, Neubauer, Niessing, Oehme, Overbeck, Petry, Salfeld, Sauer, Schadewaldt, Schmid, Schmidt, Schmitz, Schölmerich, Schwaiger, Seidel, Siess, Straub, Streicher, Vogt, von Manger König, Walcher, Wendt, Würterle,

in Montpellier

Barjon, Bertrand, Cazal, Guerrier, Jarry, Lafon, Passouant, Rimbaud, Roustan, Viallefond.

